11 月 November
2019, 62(11): 1260 - 1270
昆 虫 学 报
ACTA ENTOMOLOGICA SINICA
http://www.insect.org.cn
doi: 10.16380/j.kcxb.2019.11.003

# 有翅和无翅豌豆蚜中翅型分化信号通路相关微小 RNA 及其靶基因的表达差异

杨宗霖, 王 艺, 马田田, 霍春月, 刘 晓, 阚云超, 李丹丹*

(南阳师范学院, 河南省伏牛山昆虫生物学重点实验室, 河南南阳 473061)

**摘要:**【目的】前期研究发现麦长管蚜 *Sitobion avenae* 孤雌蚜有翅和无翅个体中存在很多差异表达的微小 RNA(microRNA, miRNA), 本研究旨在进一步明确这些 miRNA 在豌豆蚜 *Acyrthosiphon pisum* 中发挥作用的发育阶段,探索 miRNA 调控孤雌蚜翅两型性分化的机制。【方法】选择在麦长管蚜有翅蚜和无翅蚜中显著差异表达,且靶基因为蜕皮激素、胰岛素信号通路及翅型发育关键基因的 5 个 miRNA(*Let*-7, *miR-92a*, *miR-92b*, *miR-92a-1-p*5 和 *miR*-277), 利用 qPCR 检测这些 miRNA 及其靶标基因在豌豆蚜 3 - 4 龄若蚜和成虫有翅和无翅个体中的表达谱;同时利用双荧光素酶活性检测法对上述 miRNA 的靶基因进行验证。【结果】表达谱分析发现,这 5 个 miRNA 在豌豆蚜成虫中表达量均高于其在若蚜中的表达量,而其预测的靶基因在 4 龄若蚜中的表达量均高于其在成虫中的表达量,表明 miRNA 对其靶基因的调控作用可能集中在成虫阶段。分析豌豆蚜有翅和无翅个体中 5 个 miRNA 的表达情况发现,在成虫有翅个体中 5 个 miRNA 的表达量均高于无翅个体中的,其中 *miR*-277 表达差异最显著,成虫有翅个体中的表达量是无翅个体中表达量的 7.5 倍;其次为 *Let*-7,表达差异达 3 倍。而 *Let*-7 在 3 龄有翅若蚜和无翅若蚜中表达差异最显著,有翅个体中的表达量是无翅个体中的 37.8 倍;其次为 *miR*-277,表达差异达 7.6 倍。比较 5 个 miRNA 与其靶基因在豌豆蚜 3 - 4 龄若蚜及成虫有翅和无翅个体中的表达发现,miRNA *Let*-7 和 *miR-92b* 的表达趋势分别与其靶基因 *abrupt* 和 *Foxo* 的基本相反。荧光素酶活性检测结果显示,*Let*-7 的真实靶标为 *abrupt*,共转染 *Let*-7 模拟物后与对照相比,荧光素酶活性下降53%,达极显著水平。其他 miRNA 与靶标基因的互作不显著。【结论】首次发现 miRNA 对豌豆蚜孤雌蚜翅型分化相关基因的调控可能发生在成虫阶段。*Let*-7 可能通过调控 *abrupt* 基因参与孤雌蚜翅型分化。该研究为进一步探索 miRNA 参与孤雌蚜翅两型性分化的机制奠定了基础。

**关键词:** 豌豆蚜; 孤雌生殖; 翅型分化; miRNA; 靶基因; 表达谱

**中图分类号:** Q522　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 0454-6296(2019)11-1260-11

# Differences in the expression of microRNAs related to wing-morph differentiation and their target genes in the winged and wingless pea aphid, *Acyrthosiphon pisum* (Hemiptera: Aphididae)

YANG Zong-Lin, WANG Yi, MA Tian-Tian, HUO Chun-Yue, LIU Xiao, KAN Yun-Chao, LI Dan-Dan* (Henan Key Laboratory of Insect Biology in Funiu Mountain, Nanyang Normal University, Nanyang, Henan 473061, China)

**Abstract:**【Aim】Previous studies revealed that many microRNAs (miRNAs) showed differential

基金项目: 国家自然科学基金项目(31100938); 中国科协青年人才托举工程项目(YESS20150026); 南阳师范学院校级青年骨干教师培养计划项目(nynuxjqg-2019-03)

作者简介: 杨宗霖, 男, 1993 年 2 月生, 河南南阳人, 硕士研究生, 研究方向为昆虫生理生化与分子生物学, E-mail: 1216674221@qq.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: lidannytc@126.com

收稿日期 Received: 2019-06-03; 接受日期 Accepted: 2019-09-06

expression in the winged and wingless individuals of *Sitobion avenae*. This study aims to further clarify the exact stage, during which these miRNAs play roles, and to study the functions of miRNAs in the wing dimorphism of the parthenogenetic pea aphid, *Acyrthosiphon pisum*. 【Methods】Five miRNAs (*Let*-7, *miR-92a*, *miR-92b*, *miR-92a-1-p*5 and *miR*-277) with significantly differential expression levels between winged and wingless individuals of *S. avenae* and their target genes related to ecdysone, insulin signaling pathway and wing development were selected, and the expression profiles of the miRNAs and their target genes in the 3rd -4th instar nymphs and adults of *A. pisum* as well as in winged and wingless individuals were detected by qPCR. The above target genes of miRNAs were also verified by dual luciferase activity assay.【Results】The expression profiling results indicated that the expression levels of the five miRNAs in adults of *A. pisum* were higher than those in nymphs, but the expression levels of the predicted target genes in the 4th instar nymphs were higher than those in adults, suggesting that miRNAs might play regulatory roles on their target genes in the adult stage. The expression levels of five miRNAs in winged individuals were higher than those in wingless ones of adults, especially for the *miR*-277, whose expression level in winged individuals was 7.5 times as high as that in wingless individuals of adults, then followed by *Let*-7 with three-fold expression difference. Moreover, the expression difference of *Let*-7 between winged and wingless individuals of the 3rd instar nymphs was the most significant, its expression level in the winged individuals being 37.8 times as high as that in wingless ones, then followed by *miR*-277 with 7.6-fold expression difference. The expression patterns of predicted target genes *abrupt* and *Foxo* in the 3rd -4th instar nymphs and winged and wingless individuals of adults of *A. pisum* were opposite to those of miRNA *Let*-7 and *miR-92b*, respectively. Luciferase activity assay results showed that the target gene of *Let*-7 was *abrupt*, and the luciferase activity was extremely significantly decreased by 53% compared to the control after co-transfection with the mimics of *Let*-7. The interaction of other miRNAs with their target genes was not obvious.【Conclusion】We first found that the regulation of miRNAs on genes related to wing-morph differentiation of parthenogenetic *A. pisum* might occur during the adult stage. *Let*-7 may participate in the wing-morph differentiation of parthenogenetic aphids by regulating *abrupt* gene. This study lays a foundation for further exploring the mechanism of miRNAs participating in the wing dimorphism of parthenogenetic aphids.

**Key words**: *Acyrthosiphon pisum*; parthenogernesis; wing differentiation; miRNA; target gene; expression profile

蚜虫是世界第一大类农林害虫，广泛分布于世界各地，种类超过 4 000 余种（乔格侠等，2005；刘征等，2009）。蚜虫通过刺吸植物汁液、掠夺植物营养，从而影响植物生长发育，导致其产量和品质下降。同时，蚜虫在取食期间还可间接传播多种植物病毒，全世界 193 种蚜虫可以传播 164 种植物病毒，其传播能力居病毒媒介昆虫首位，对粮食作物、油料作物、糖料作物、蔬菜、烟草和果树等多种植物都造成了严重危害（曹治珊和蒋金炜，2012）。全国农作物重大病虫害发生趋势预报显示，预计 2019 年全国蚜虫发生面积可达 1 466.67 万 $hm^2$（全国农业技术推广中心，2019），防治任务依然艰巨。

孤雌生殖是蚜虫的主要繁殖方式，在种群密度升高时，孤雌蚜会从无翅转变为有翅状态，进行远距离迁飞，形成大规模危害（Zera and Denno，1997）。蚜虫翅型分化受多种因素的调控，包括种群密度、宿主植物营养状况、温度和光周期等，高种群密度、营养状况恶化都会诱导无翅孤雌蚜产生更多的有翅后代（Müller *et al.*，2001；Braendle *et al.*，2006）。从分子机制角度，目前的研究表明激素信号通路和表观遗传修饰在昆虫翅型分化中发挥关键作用，如 Hardie（1980）给豆蚜 *Aphis fabae* 1 龄若蚜施加保幼激素处理后，会导致有翅个体转变为无翅状态。另外 Vellichirammal 等（2017）通过注射蜕皮激素及其类似物会造成有翅后代数量下降；相反通过 RNA 干涉（RNA interference，RNAi）EcR 受体或施加 EcR 抑制物则会导致后代有翅个体增加。对褐飞虱 *Nilaparvata lugens* 研究表明，胰岛素信号通路在其

翅两型性分化中发挥着重要作用,两个胰岛素受体家族成员 InR1 和 InR2 作为翅型分化的开关,调控其下游叉头框转录因子家族 O (Forkhead transcription factor subgroup O, Foxo) 的表达,用 RNAi 干涉 *InR*1 表达时,导致短翅个体增多,而干涉 *InR*2 表达后,长翅个体比例上升(Xu *et al*., 2015)。最近 Zhang 等(2019)在禾谷缢管蚜 *Rhopalosiphum padi* 中的研究表明,生物胺、蜕皮激素、保幼激素、胰岛素信号通路在蚜虫翅型分化中发挥关键作用,另外 33 个与翅型发育相关的基因在不同发育阶段的有翅和无翅蚜中存在着显著的差异表达,如 *Wnt*2, *Uba*1, *flightin* 和 *wingless* 等。

表观遗传修饰参与昆虫翅多型性分化的研究主要集中在 miRNA 和 DNA 甲基化两个方面,目前尚未发现有翅和无翅孤雌蚜在基因组 DNA 甲基化方面存在显著差异(Walsh *et al*., 2010; Gong *et al*., 2012),但 miRNA 在昆虫翅型分化中的作用不容忽视。如在果蝇中敲除 *miR*-7 会导致翅细胞减小,翅尺寸变小(Aparicio *et al*., 2015)。Li 等(2016)通过 RNA-Seq 技术在麦长管蚜 *Sitobion avenae* 中鉴定到 345 个 miRNA,其中 16 个 miRNA 的表达在有翅孤雌蚜中出现显著上调,另外 12 个在无翅孤雌蚜中的表达显著上调,但对这些 miRNA 的功能没有更深入的研究。因此,为进一步探索 miRNA 在豌豆蚜 *Acyrthosiphon pisum* 翅型分化中的调控机制,我们选择在麦长管蚜有翅和无翅孤雌蚜中差异表达、且靶基因为蜕皮激素、胰岛素信号通路及翅型发育相关的关键基因的 miRNA 作为研究对象,对这些 miRNA 及其靶基因在豌豆蚜孤雌蚜若蚜及成虫阶段的表达谱进行了研究,并对靶基因进行了验证,从 miRNA 角度探索孤雌蚜翅型分化的分子机制,为蚜虫的预测预报和综合防治提供理论基础。

# 1 材料与方法

## 1.1 试虫来源

所用豌豆蚜由中国科学院动物研究所崔峰研究员惠赠。

## 1.2 豌豆蚜培养及取样

将蚕豆种子置于 25℃浸泡 12 h;将东北黑土与蛭石以 1∶2(v/v)混合,播种蚕豆种子,置于恒温气候培养箱(温度 28℃,光周期 14L∶10D,相对湿度 60%,光照强度 15 000 lx)中培养。待蚕豆展开两片真叶时移入塑料杯(直径 8 cm,高 14 cm)中,用毛笔挑取豌豆蚜 1 龄若蚜 5 头置于恒温气候培养箱(温度 20℃,光周期 16L∶8D,相对湿度 60%,光照强度 15 000 lx)中培养,低密度连续筛选两代至后代均为孤雌无翅蚜后用于实验。同一批次培养的蚜虫分为两份,一份正常低密度培养,另一份利用 Vellichirammal 等(2016)改良的方法进行拥挤处理,将 10 头无翅成蚜放置在小塑料培养皿(32.5 mm × 15 mm)中拥挤处理 24 h(共处理 100 头),随后每 5 头转移至 1 个种植有豌豆苗的塑料杯(直径 8 cm,高 14 cm)中。两种处理的成虫所产后代养至 3 龄若蚜、4 龄若蚜和成虫时,分别进行有翅和无翅个体取样,将蚜虫整头投入液氮中速冻保存,TRIzol 法提取总 RNA,用于 cDNA 合成。

## 1.3 miRNA 靶基因预测

Zhang 等(2019)在禾谷缢管蚜 *Rhopalosiphum padi* 中的研究表明,蜕皮激素、保幼激素和胰岛素信号通路在蚜虫翅型分化中发挥关键作用,其中包括 *Wnt*2, *Uba*1, *flightin* 和 *wingless* 等关键基因。Li 等(2016)在麦长管蚜 *S. avenae* 中发现 miRNA 对蚜虫翅型分化相关基因具有广泛的调控作用,但对 miRNA 进行靶基因预测时选用的基因组数据除蚜虫外,还包括果蝇和人等物种。因此我们利用 Li 等(2016)研究结果,选择豌豆蚜蜕皮激素、胰岛素信号通路基因及蚜虫翅型发育几个关键基因 *abrupt*, *Usp*, *flightin*, *Uba*1, *wingless* 和 *Foxo* 作为研究对象,使用 miRanda (Anton *et al*., 2003)和 RNAhybrid 软件(Rehmsmeier *et al*., 2004),检测蚜虫所有 miRNA 的种子序列区与这些基因的匹配程度,$P$-value ≤ 1,允许 G∶U 配对。筛选出既能靶向修饰豌豆蚜翅型发育关键基因,又在麦长管蚜有翅和无翅个体中差异表达显著的 miRNA 9 个(*Let*-7, *miR-9a*, *miR-92a*, *miR*-92, *miR-92a-1-p*5, *miR-996-p*5, *miR-3020-p*3, *miR*-277 和 *PC-3p*-94006-17)。豌豆蚜靶基因序列来源于 NCBI。miRNA 数据来源于 miRbase。

## 1.4 qPCR 检测 miRNA 及靶基因的表达谱

Li 等(2016)在麦长管蚜中鉴定到一些 miRNA 在有翅和无翅孤雌蚜中出现显著变化,但该研究是在麦长管蚜中开展的,且只有成蚜阶段的结果。为进一步研究这些 miRNA 在豌豆蚜不同发育阶段有翅和无翅个体中的表达情况,界定出其发挥作用的具体时期,我们选择与靶基因匹配度较好的 5 个 miRNA(*Let*-7, *miR-92a*, *miR-92b*, *miR-92a-1-p*5 和 *miR*-277),利用 qPCR 检测 miRNA 及其靶基因在豌豆蚜 3－4 龄若蚜和成虫有翅及无翅个体中的表达

情况。取 1.2 节各时期豌豆蚜孤雌有翅和无翅个体总 RNA 各 2 μg，使用 PrimeScript™ Ⅱ 1st Strand cDNA Synthesis Kit（TaKaRa）和 All-in-One™ miRNA qRT-PCR Detection Kit（GeneCopoeia）分别合成用于靶基因和 miRNA 扩增的 cDNA。miRNA qPCR 上游引物为成熟 miRNA 自身序列，下游引物为 All-in-One™ miRNA qRT-PCR Detection Kit（GeneCopoeia）内通用引物；靶基因 qPCR 引物用 Primer Premier 5.0 软件设计，长度在 150 bp 左右。靶基因 PCR 反应体系（10 μL）：cDNA 0.5 μL，上下游引物终浓度为 0.5 μmol/L，FastStart Universal SYBR Green Mix（Roche）5 μL。内参基因为 *actin*。PCR 反应条件：95℃变性 30 s；55℃退火 30 s，72℃延伸 30 s，40 个循环。miRNA PCR 反应体系（10 μL）：5 倍稀释的 cDNA 1 μL，miRNA 上游特异引物终浓度 0.5 μmol/L，下游引物为试剂盒通用引物 Universal Adaptor PCR Primer 终浓度 0.5 μmol/L，2 × All in one qPCR Mix 5 μL。PCR 反应条件：95℃ 变性 10 s；55℃退火 20 s，72℃延伸 30 s，40 个循环。内参基因为 *U*6。所用引物见表 1。

**表 1　引物信息**

**Table 1　Primer amplification**

| 基因及 GenBank 登录号<br>Gene and GenBank accession number | 引物序列（5′－3′）<br>Primer sequences | 用途<br>Purpose |
|---|---|---|
| *Let*-7（NR_040129） | F：TGAGGTAGTTGGTTGTATAGT | 荧光定量 PCR 中 miRNA 扩增<br>Amplification of the miRNA in real-time PCR |
| *miR-92a*（NR_040165） | F：TATTGCACATGTCCCGGCCAAT | |
| *miR-92b*（NR_040167） | F：TATTGCACTTGACCCAGCCTGC | |
| *miR-92a-1-p5*（NR_040129） | F：TGGTCGACGACTTGTGCAACTATT | |
| *miR*-277（NR_040143） | F：TAAATGCACTATCTGGTACGACA | |
| *U*6（KU050837） | F：CGCAAGGATGACACGCAA | 荧光定量 PCR 中内参基因扩增<br>Amplification of the internal reference gene in real-time PCR |
| *Usp*（NM_001161668） | F：GCATAGAAGTTGAACCCAC<br>R：GCTTGACAAATAGCACCA | 荧光定量 PCR 中靶基因扩增<br>Amplification of the target gene in real-time PCR |
| *Flightin*（XM_001944085） | F：TGAACAGGCGACAGAGGG<br>R：CCGGCAAATGGACGGTATT | |
| *wingless*（AB627783） | F：ATGAGACTGCCCATATTCCG<br>R：GTTGGTCCTGTGACTGTTCCT | |
| *Foxo*（XM_001944687） | F：TCGTCGTGGTGGCAGATA<br>R：GCTAGGACTAGGCGTGTT | |
| *Uba*1（XM_001943472） | F：CTGAAGAAGATGCCAAGC<br>R：CACCCATAATCGCAAAGT | |
| *Abrupt*（XM_001943228.5） | F：CCCGAGGACCTGACCGTGAA<br>R：TTGCTGCGAGTCGCTGAACC | |
| *actin*（NM_001142636） | F：CAGAAGAGCACCCAATCC<br>R：GAGACACCGTCACCAGAG | 荧光定量 PCR 中内参基因扩增<br>Amplification of the internal reference gene in real-time PCR |
| *Abrupt*（XM_001943228.5） | F：CCGCTCGAGTTTCGTTCGTGCCATAGT<br>R：GCTCTAGATTAATGAAACAAGTATATTT | pmirGlO［*abrupt*］荧光素酶报告基因载体构建中 *abrupt* 3′ UTR 序列克隆<br>Cloning of 3′ UTR of *abrupt* gene to construct the overexpression vector of pmirGlO［*abrupt*］with luciferase reporter genes |
| *Let*-7 mimics | UGAGGUAGUUGGUUGUAUAGU | *Let*-7 模拟物扩增用于检测 miRNA 与靶基因互作<br>Amplification of *Let*-7 mimics to detect the interaction between miRNA and target gene |
| *Let*-7 mutant mimics | ACUUUAUCAUUUAAUUAUAGU | *Let*-7 突变模拟物扩增用于检测 miRNA 与靶基因互作<br>Amplification of *Let*-7 mutant mimics to detect the interaction between miRNA and target gene |
| NC mimics | UUCUCCGAACGUGUCACGUTT | 阴性对照，用于检测 miRNA 与靶基因互作<br>The negative control to detect the interaction between miRNA and target gene |

下划线部分为酶切位点，波浪线部分为保护碱基。The underlined section is the cleavage site of restriction enzyme, while the wavy lined section is the protected bases.

### 1.5 双荧光素酶报告基因系统检测 miRNA 与靶基因的体外互作

**1.5.1** 靶基因 3′UTR 荧光素酶报告基因载体构建：以豌豆蚜 4 龄若蚜的 cDNA 为模板，使用表 1 引物扩增 *abrupt* 基因 3′UTR 494 bp 序列。PCR 反应体系(20 μL)：cDNA 1 μL，上下游引物终浓度为 0.5 μmol/L，Premix Ex Taq™ Hot Start Version (TaKaRa) 10 μL。PCR 反应条件：95℃ 预变性 5 min；95℃ 变性 30 s，65℃ 退火 30 s，72℃ 延伸 30 s，30 个循环；72℃ 延伸 10 min。PCR 产物用 1% 琼脂糖电泳检测。使用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒(Axygen)回收目的条带，连接 pMD19-T Simple 载体(TaKaRa)。转化后，菌液 PCR 检测连接效果，送菌液至苏州泓迅生物科技股份有限公司测序。测序正确的菌液提质粒，用 *Xho* Ⅰ和 *Xba* Ⅰ双酶切后连接在 pmirGLO 双荧光素酶报告基因载体(Promega)上。经转化、菌液 PCR 检测、测序等步骤确定载体是否构建成功。测序正确的菌液重新摇菌，用去内毒素质粒提取试剂盒(Omega)提取质粒，用于细胞系的转染。

**1.5.2** miRNA mimics 合成：依据 *Let*-7 成熟 miRNA 序列，由上海吉玛制药技术有限公司合成 miRNA mimics、阴性对照(NC)和 miRNA 突变体(mutant mimics)(引物序列见表 1)。

**1.5.3** 细胞转染及荧光素酶活性测定：HEK293T 细胞在含有 10% 胎牛血清(Gibco)的 DMEM 培养基(Biological Industry)中 25 $cm^2$ 培养瓶传代培养，温度 37℃，$CO_2$ 浓度 5%。按每孔 $2\times10^5$ 个细胞铺 24 孔板，使用 X-tremeGENE siRNA Transfection Reagent (Roche)转染 miRNA mimics 和靶基因荧光素酶报告基因载体。miRNA mimics 转染浓度为 100 nm/孔，质粒转染浓度为 100 ng/孔。实验设置 5 组(以 *Let*-7 和 *abrupt* 互作为例)：正常培养细胞；转染 pmirGLO[*abrupt*]空载体；共转染 pmirGLO[*abrupt*]与 NC mimics；共转染 pmirGLO[*abrupt*]与 *Let*-7 mimics；共转染 pmirGLO[*abrupt*]与 *Let*-7 mutant mimics。每组设样品重复 3 个，实验重复 3 次。转染 48 h 后，用细胞裂解液裂解细胞，取 20 μL 细胞裂解液，按照双荧光素酶报告基因检测试剂盒(Promega)步骤，检测样品荧光值。靶基因位于 Firefly 荧光素酶基因下游，因此用获得的 Firefly 荧光素酶活性(F)/内参 Renilla 荧光素酶活性(R)，获得每组 3 个样品及 3 个重复的 R/F 值，均一化后用 Excel 软件进行作图。

### 1.6 数据分析

数据分析同李新梅等(2018)方法。PCR 结果采用 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 法计算相对表达量高低(Ct 为循环阈值，表示每一个反应管内的荧光信号到达设定的阈值时所经历的循环数，△Ct = 目的基因的平均 Ct 值 − 内参基因的平均 Ct 值，△△Ct = △Ct 样本 1 − △Ct 样本 2)。实验独立生物学重复 3 次，每样品测定技术重复 3 次，数据为 3 次独立生物学实验平均值分析结果。样品内标准差分析应用 SPSS Statistics 22.0 软件，样本间的差异采用单因素方差分析方法检测。数据分析采用单因素方差分析和 Turkey 氏检验。

## 2 结果

### 2.1 miRNA 靶基因预测

miRNA 靶基因预测结果如图 1，*Let*-7 和 *PC-3p-94006-17* 的种子序列与 *abrupt* 的 3′UTR 匹配较好(图 1：A)；*miR-9a* 与 *flightin* 的 5′UTR 匹配较好(图 1：B)；*miR-92a* 与 *wingless*(图 1：C)的 CDS 区匹配较好；*miR-92b* 和 *miR-996-p5* 分别与 *Foxo* 的 CDS 区匹配较好(图 1：D)；*miR*-277 与 *Uba*1 5′UTR 区匹配较好(图 1：E)；*miR-92a-1-p5* 与 *ultraspiracle* (*Usp*)的 CDS 区匹配度较好，而 *miR*-3020-*p*3 与 *Usp* 的 3′UTR 匹配度较好(图 1：F)，表明这些基因可能为 miRNA 的靶基因。

### 2.2 miRNA 在不同龄期豌豆蚜有翅和无翅个体中的表达谱

为进一步研究在豌豆蚜不同发育阶段有翅和无翅个体中的表达情况，我们选择 5 个 miRNA，荧光定量 PCR 检测其在豌豆蚜 3 龄、4 龄若蚜和成虫有翅及无翅个体中的表达情况。结果表明(图 2)，*Let*-7，*miR-92a*，*miR-92b*，*miR-92a-1-p5* 和 *miR*-277 5 个 miRNA 在成虫中表达量均高于在若虫中的表达量，表明 miRNA 可能在成虫阶段发挥作用。同时，5 个 miRNA 在成虫有翅个体中的表达量均高于无翅个体中的表达量，其中 *miR*-277 表达差异最显著，有翅个体中的表达量是无翅个体中的 7.5 倍($P<0.01$)(图 2：E)；其次为 *Let*-7，其在成虫有翅个体中的表达量是无翅个体中的 3 倍($P<0.01$)(图 2：A)。另外，5 个 miRNA 在 3 龄若蚜有翅个体中的表达量也均高于在无翅个体中的表达量，其中 *Let*-7 在有翅蚜和无翅蚜中表达差异最显著，有翅个体中的表达量是无翅个体中的 37.8 倍($P<0.01$)(图 2：

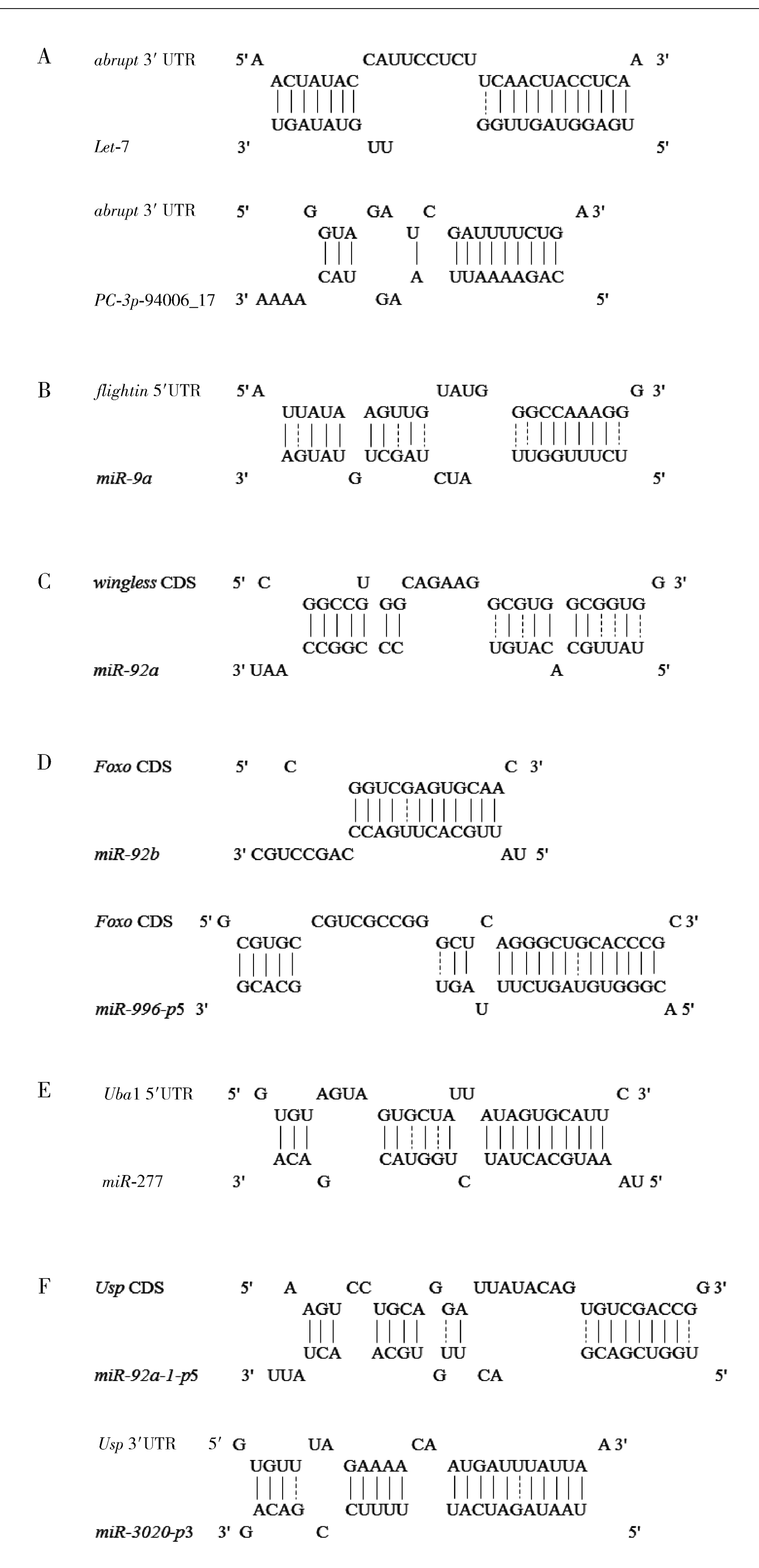



图 1　miRNA 靶基因预测结果(miRanda 和 RNAhybrid 软件预测)

Fig. 1　Predication results of miRNA targets by the software of miRanda and RNAhybrid

A：*Let*-7 和 *PC-3p*-94006-17 与 *abrupt* 匹配结果 Matching results of *Let*-7 and *PC-3p*-94006-17 with *abrupt*；B：*miR-9a* 与 *flightin* 匹配结果 Matching results of *miR-9a* with *flightin*；C：*miR-92a* 与 *wingless* 匹配结果 Matching results of *miR-92a* with *wingless*；D：*miR-92b* 和 *miR-996-p*5 与 *Foxo* 匹配结果 Matching results of *miR-92b* and *miR-996-p*5 with *Foxo*；E：*miR*-277 与 *Uba*1 匹配结果 Matching results of *miR*-277 with *Uba*1；F：*miR-92a-1-p*5 和 *miR-3020-p*3 与 *Usp* 匹配结果 Matching results of *miR-92a-1-p*5 and *miR-3020-p*3 with *Usp*.

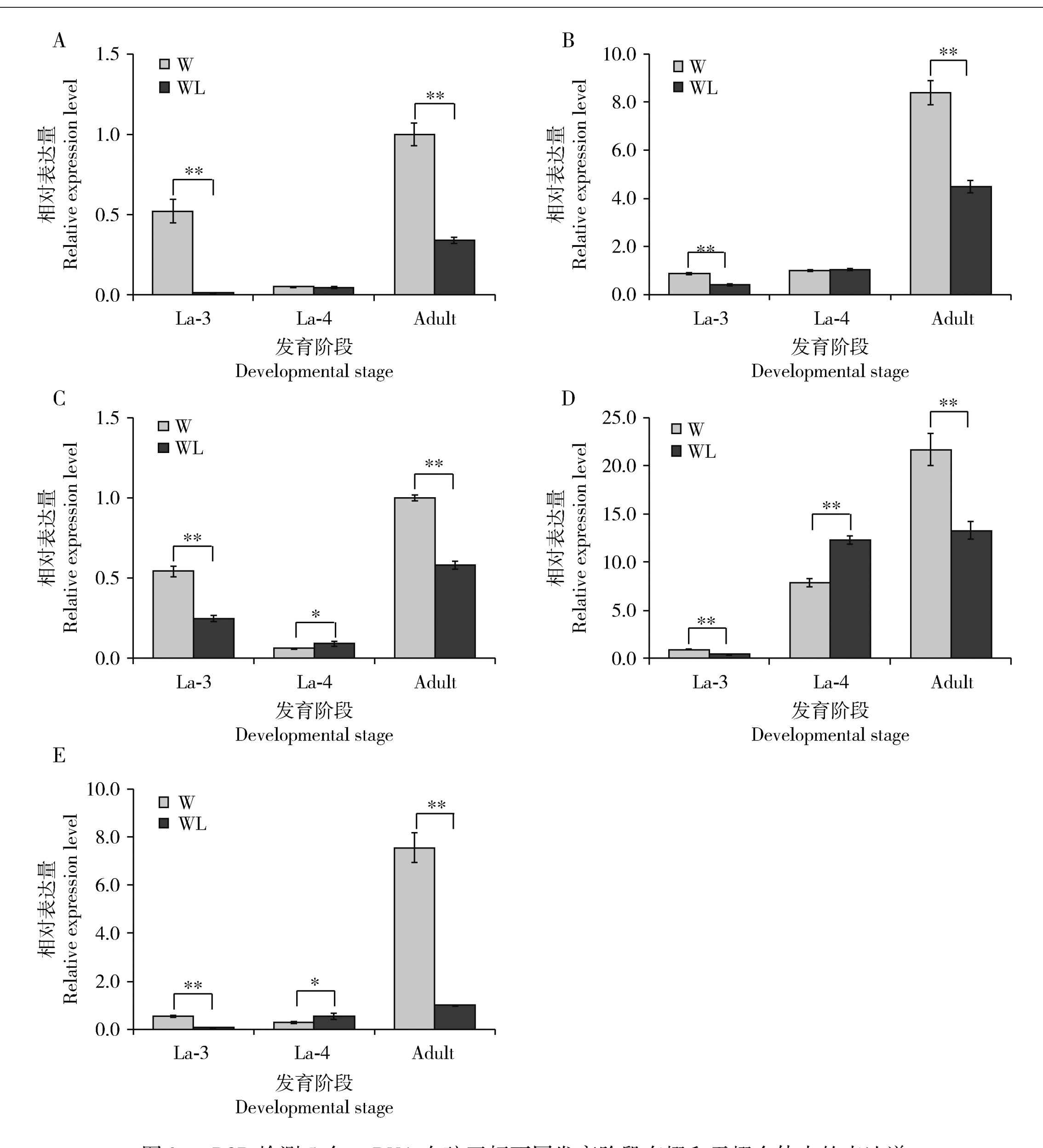



图 2 qPCR 检测 5 个 miRNA 在豌豆蚜不同发育阶段有翅和无翅个体中的表达谱

Fig. 2 Expression profiles of five miRNAs in different developmental stages of winged and wingless *Acyrthosiphon pisum* individuals by qPCR

A: *Let-7*; B: *miR-92a*; C: *miR-92b*; D: *miR-92a-1-p5*; E: *miR-277*. W: 有翅个体 Winged individuals; WL: 无翅个体 Wingless individuals; La-3 - 4: 分别为 3 - 4 龄若蚜 3rd - 4th instar nymph, respectively; Adult: 成虫 Adult. *U6* 为内参基因 *U6* was used as the reference gene. 星号和双星号分别表示单因素方差分析表达量差异显著($P < 0.05$)和极显著($P < 0.01$)。The asterisk and double asterisk represent statistically significant difference ($P < 0.05$) and extremely significant difference ($P < 0.01$) by one-way ANOVA, respectively. 图 3 和 4 同 The same for Figs. 3 and 4.

A),其次为 *miR-277*,表达差异达 7.6 倍($P < 0.01$)(图 2: E)。另外, *miR-92b*, *miR-92a-1-p5* 和 *miR-277* 在 4 龄无翅若蚜虫中表达量高于有翅蚜中的表达量,尤其是 *miR-92a-1-p5*($P < 0.01$),差异达极显著水平(图 2: C, D 和 E),表明其在不同龄期可能发挥着不同的作用。

### 2.3 miRNA 靶基因在不同龄期豌豆蚜有翅和无翅个体中的表达谱

为进一步探索 miRNA 靶基因在豌豆蚜不同龄期有翅和无翅个体中的表达情况,利用 qPCR 对预测的靶基因在 3 - 4 龄若蚜和成虫有翅和无翅个体中的表达情况进行了验证。结果发现(图 3),除 *wingless* 和 *Foxo* 外,其他 4 个 miRNA 预测的靶基因在 4 龄若蚜有翅和无翅个体中的表达量均高于其在成虫中的表达量,与 miRNA 表达趋势相反,表明 miRNA 对其靶基因的调控作用可能发生在成虫阶段。

*Let-7* 预测的靶基因 *abrupt* 在若蚜及成虫无翅

个体中表达量均显著高于有翅个体中的（$P < 0.01$），且无翅个体中的表达量从 3 龄若蚜至成虫呈逐渐下降趋势（图 3：A）。

*wingless* 在 3 龄若蚜无翅个体中表达量极显著高于有翅个体中的（$P < 0.01$）（图 3：D），与 *miR-92a* 在该龄期的表达趋势（图 2：B）相反，但 4 龄若蚜和成虫中 miRNA（图 2：B）与预测的靶基因（图 3：D）之间表达谱相关性不强。*Uba*1 在 3 龄若蚜和成虫无翅个体中表达量均极显著高于其在有翅个体中的（$P < 0.01$），而在 4 龄若蚜有翅个体中表达量极显著高于其在无翅个体中的（$P < 0.01$）（图 3：C），与 *miR-277* 在 3 个发育期有翅和无翅个体中的表达趋势（图 2：E）相反。*Foxo* 在 4 龄有翅若蚜个体中表达量显著高于其在无翅个体中的（$P < 0.05$）（图 3：E），其在 3 龄若蚜及成虫无翅个体中的表达量高于其在有翅个体中的，与 *miR-92b* 的表达量（图 2：C）呈现相反的表达趋势。

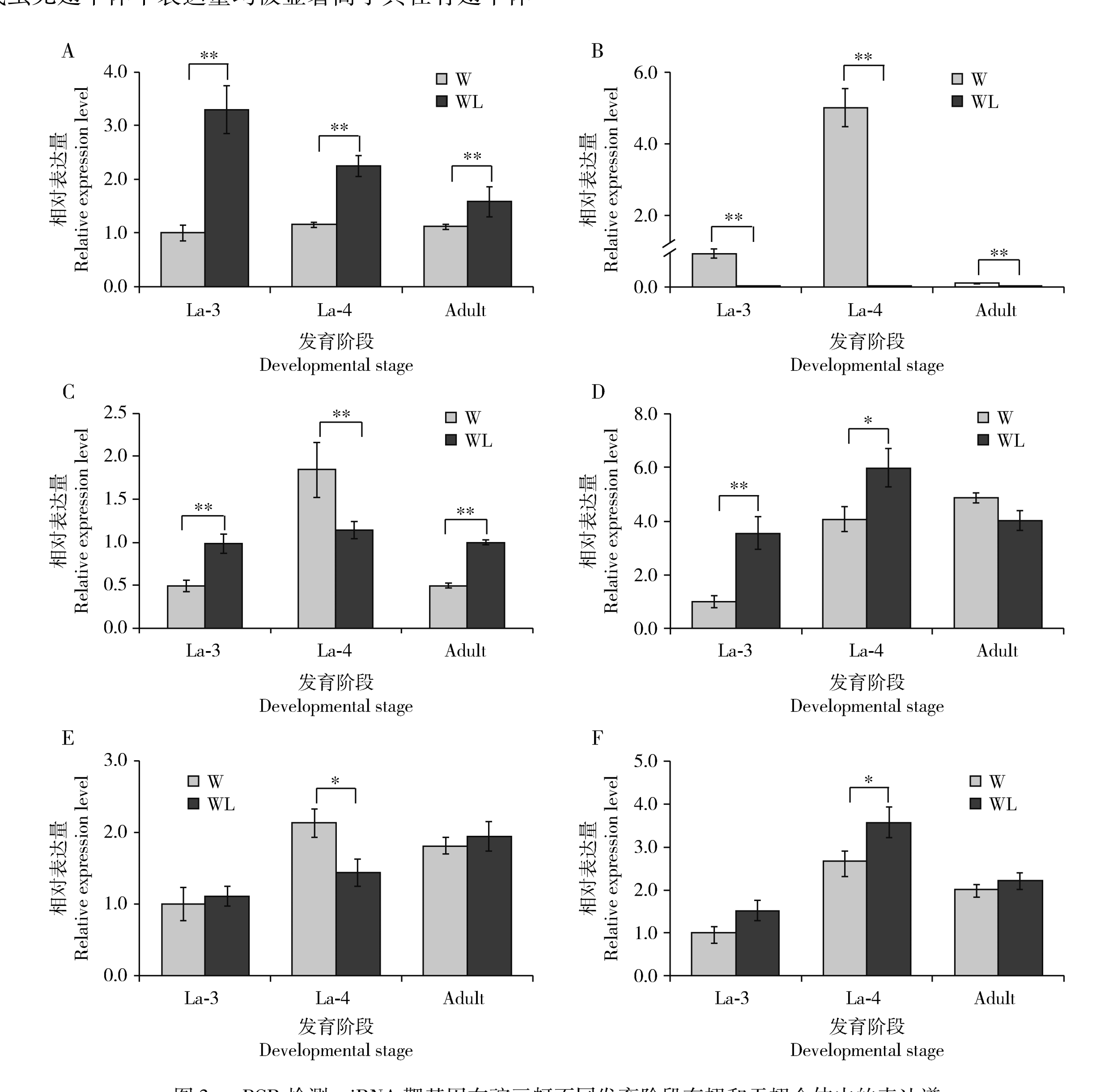



图 3　qPCR 检测 miRNA 靶基因在豌豆蚜不同发育阶段有翅和无翅个体中的表达谱

Fig. 3　Expression profiles of miRNA target genes in different developmental stages of winged and wingless *Acyrthosiphon pisum* individuals by qPCR

A：*abrupt*；B：*flightin*；C：*Uba*1；D：*wingless*；E：*Foxo*；F：*Usp*. W：有翅个体 Winged individuals；WL：无翅个体 Wingless individuals；La-3 –4：分别为 3 –4 龄若蚜 3rd –4th instar nymph，respectively；Adult：成虫 Adult. 以 *actin* 作内参基因 *actin* was used as the reference gene.

## 2.4　miRNA 靶基因验证

为了验证 miRNA 靶标基因的真实性，利用双荧光素酶报告基因系统检测 miRNA 与预测的靶基因之间的互作关系。首先构建靶标基因 *abrupt* 3′UTR

荧光素酶报告基因载体 pmirGlO［*abrupt*］，*abrupt* 3′UTR 扩增结果如图 4(A)所示，PCR 产物电泳条带单一，494 bp 位置正确。pmirGlO［*abrupt*］双酶切结果如图 4(B)，能够酶切出正确的 *abrupt* 3′UTR 条带，测序结果正确。共转染 *Let*-7 模拟物和 *abrupt* 3′UTR 过表达载体 pmirGlO［*abrupt*］后，细胞荧光素酶活性比共转染 *Let*-7 突变物和 pmirGlO［*abrupt*］细胞的下降了 53%，达极显著水平($P < 0.01$)(图 4：C)，表明 *abrupt* 为 *Let*-7 的真实靶标。

其他几个 miRNA 与靶基因在 HEK293T 细胞系中互作结果显示，这些 miRNA 与靶基因之间的互作并不显著(结果未显示)。

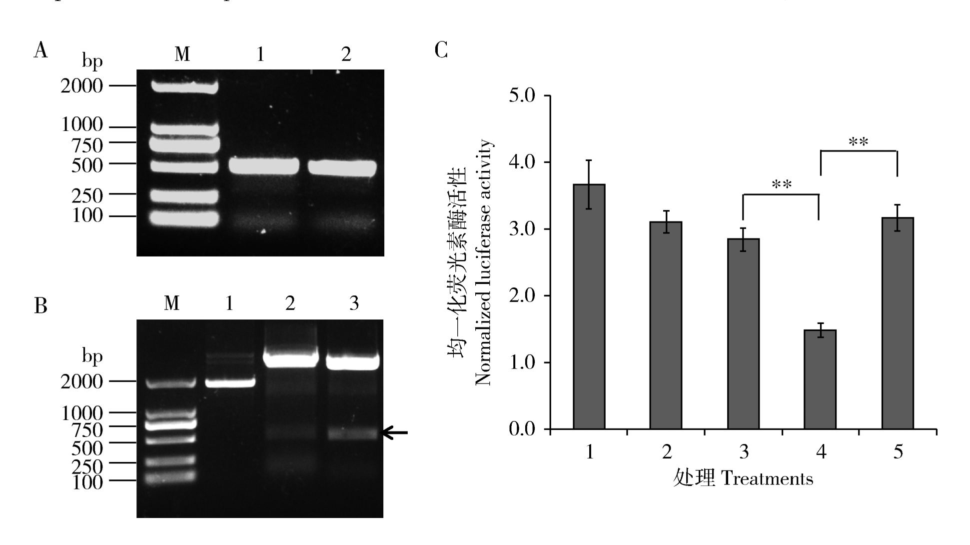



图 4 双荧光素酶报告基因系统验证 miRNA 靶基因

Fig. 4 Verification of miRNA target gene by luciferase activity analysis

A：载体 pmirGlO［*abrupt*］PCR 检测 PCR detection of the vector pmirGlO［*abrupt*］. M：DL2000 marker；1 – 2：*abrupt* 3′UTR 扩增产物 Amplification product of the 3′UTR of *abrupt* gene. B：载体 pmirGlO［*abrupt*］双酶切鉴定 Double digestion result of the vector pmirGlO［*abrupt*］. M：DL2000 marker；1：pmirGlO 双酶切产物 Double digestion product of pmirGlO；2 – 3：pmirGlO［*abrupt*］双酶切产物 Double digestion product of pmirGlO［*abrupt*］. 箭头示酶切获得的 *abrupt* 3′UTR 494 bp 序列 Arrow shows the digested 494 bp sequence of *abrupt* 3′UTR. C：HEK293 细胞系中荧光素酶活性试验检测 miRNA *Let*-7 的靶基因 *abrupt* (Verification of target gene *abrupt* of miRNA *Let*-7 by luciferase activity analysis in HEK293 cells). 1：无任何处理的 HEK293 细胞 Normal HEK293 cells；2：转染带有 *abrupt* 3′UTR 的 pmirGlO［*abrupt*］载体细胞 Cells transfected with pmirGlO［*abrupt*］containing the 3′UTR of *abrupt*；3：共转染 pmirGlO［*abrupt*］+ 阴性对照 mimics 细胞 Cells transfected with pmirGlO［*abrupt*］and negative control mimics；4：共转染 pmirGlO［*abrupt*］载体 + *Let*-7 模拟物细胞 Cells transfected with pmirGlO［*abrupt*］and *Let*-7 mimics；5：共转染 pmirGlO［*abrupt*］载体 + *Let*-7 突变物细胞 Cells transfected with pmirGlO［*abrupt*］and *Let*-7 mutant mimics.

## 3 讨论

蜕皮激素信号通路、胰岛素信号通路和 miRNA 在昆虫翅多型性分化中发挥着重要作用(Zhang *et al*., 2018；Zhang *et al*., 2019)。Zhang 等(2019)研究禾谷缢管蚜有翅和无翅孤雌蚜转录组数据发现，*Uba*1 和 *Foxo* 在 1 – 2 龄若蚜中表达量较低，在 3 龄若蚜到成虫中的表达量较高；同样 *flightin* 在 1 – 3 龄若蚜表达量较低，4 龄若蚜和成虫中表达量较高，我们在豌豆蚜中发现 *flightin* 在 4 龄若蚜有翅个体中出现高表达，表明这些关键信号通路基因在豌豆蚜中具有相似的调控作用。同时，我们检测豌豆蚜 miRNA 及几个与翅型发育相关基因表达的变化发现，5 个 miRNA 在成虫期表达量均高于 4 龄若蚜期的表达量，且多在成虫有翅个体中高表达，尤其是 *miR*-277(图 2：E)和 *Let*-7(图 2：A)。这与 Li 等(2016)的结果是一致的，表明 miRNA 在不同种的蚜虫间保守性较高，其表达趋势也基本一致。而 *miR*-277 和 *Let*-7 的靶基因 *Uba*1(图 3：C)和 *abrupt*(图 3：A)则多在 4 龄和 3 龄若蚜中高表达，且二者在成虫无翅个体中表达量均显著高于有翅个体中的。表明成虫后随着有翅个体中 miRNA 表达量的增加，其对靶基因的抑制作用逐渐增强，说明 miRNA 对其靶基因的调控可能更多的集中在成虫阶段。在德国小蠊 *Blattella germanica* 中也发现 *Let*-7，*miR*-100 和 *miR*-125 在末龄幼虫中大量表达，敲减 *Let*-7 会造成翅脉畸形(Gomez-Orte and Belles，2009)，这也从侧面证明 miRNA 对其靶基因的调控可能更多发生在幼虫至成虫过渡期或成虫期。

*Lin*-4 和 *Let*-7 是最早在线虫中发现的时序开关基因，在很多物种中广泛存在，进化上保守性较高（Ambros，2000；Reinhart *et al*.，2000）。果蝇 *Let-7-complex*（*Let-7-C*）可转录出 *miR*-100，*miR*-125 和 *Let*-7 3 个 miRNA，它们受蜕皮激素 20E 和 *Broad* 的调控（Sempere *et al*.，2002；Prochnik *et al*.，2007；Garbuzov and Tatar，2010；Chawla and Sokol，2012）。果蝇 *Let*-7 的靶标为 *abrupt*，其被蜕皮激素诱导的 miRNA *Let*-7 转录后抑制，缺失 *Let*-7 会导致 *abrupt* 过表达，使成虫背腹部的神经肌肉接头发育受阻，导致果蝇不具备成虫特征（Caygill and Johnston，2008；Sokol *et al*.，2008）。在家蚕 *Bombyx mori* 中，Ling 等（2014）发现 *Let*-7 通过介导 *FTZ-F*1 和 *E*74 的转录后修饰参与蜕皮调控，敲低 *Let*-7 表达后，会导致家蚕蜕皮异常。蚜虫中 *Let*-7 靶标的预测及验证结果显示，*abrupt* 的 3′UTR 与 *Let*-7 的种子序列匹配度最高。*Let*-7 在 3 个龄期有翅个体中表达量均高于无翅个体，且成虫有翅个体中表达量显著高于若蚜有翅个体中的（图 2），与 *abrupt*（图 3：A）基本呈现相反的表达趋势，表明 *abrupt* 可能为 *Let*-7 的真实靶标。荧光素酶活性检测结果显示 *Let*-7 参与了 *abrupt* 的转录后修饰。abrupt 为 BTB-ZF 类转录因子，是蜕皮激素信号通路的负调控蛋白，能够调节动物存活、器官发生和组织形态发生、上皮细胞命运、神经元分化和身份转换等多个生命过程（Kucherenko *et al*.，2012；König and Shcherbata，2015）。表明 *Let*-7 可能通过直接靶向修饰 *abrupt* 而间接调控蜕皮激素信号通路基因的表达从而参与蚜虫翅型的分化。

昆虫基因功能的研究可采用个体直接注射双链 RNA 或过表达载体的方法进行，个体直接注射法在黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*（Kennerdell and Carthew，1998）、家蚕（Li *et al*.，2015；Zhou *et al*.，2017）和桃蚜 *Myzus persicae*（Cheng and Li，2018）等很多物种中都取得了成功。但蚜虫个体显微操作较其他物种难，用显微注射针刺破蚜虫腹部表皮后很容易引起个体内容物溢出过多而造成其死亡。最近 Zheng 等（2019）用纳米材料/变性剂在大豆蚜 *Aphis glycines* 中导入 dsRNA 实现了部分编码基因的 RNA 干涉，利用该方法直接导入 miRNA 的模拟物或抑制物目前还处于探索阶段。因此对 miRNA 在蚜虫个体中的功能验证还需要一段时期的摸索。

本研究首次发现了 miRNA 对翅型发育相关基因的调控可能发生在成虫阶段，为从非编码 RNA 角度研究孤雌蚜翅型分化的分子机制奠定了一定的理论基础。

## 参考文献（References）


Ambros V, 2000. Control of developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 10(4): 428－433.

Anton JE, Bino J, Ulrike G, Thomas T, Chris S, Debora SM, 2003. MicroRNA targets in *Drosophila*. *Genome Biol.*, 5(1): R1.

Aparicio R, Da SCJ, Busturia A, 2015. MicroRNA *miR*-7 contributes to the control of *Drosophila* wing growth. *Dev. Dyn.*, 244(1): 21－30.

Braendle C, Davis GK, Brisson JA, Stern DL, 2006. Wing dimorphism in aphids. *Heredity*, 97(3): 192－199.

Cao ZS, Jiang JW, 2012. Study on the interaction of aphids-plant-virus. In: Proceedings of the 2012 Annual Academic Meeting of the Entomological Society of Central China (Hubei, Hunan, Henan) and National Symposium on Termite Control on October 26, 2012 in Yichang, Hubei, China.［曹治珊，蒋金炜，2012. 蚜虫-植物-病毒的相互关系的研究概况. 见：华中三省（湖北、湖南、河南）昆虫学会 2012 年学术年会暨全国白蚁防治学术研讨会论文集，2012-10-26，湖北宜昌］

Caygill EE, Johnston LA, 2008. Temporal regulation of metamorphic processes in *Drosophila* by the *Let*-7 and *miR*-125 heterochronic microRNAs. *Curr. Biol.*, 18(13): 943－950.

Chawla G, Sokol NS, 2012. Hormonal activation of *Let-7-C* microRNAs via EcR is required for adult *Drosophila melanogaster* morphology and function. *Development*, 139(10): 1788－1797.

Cheng YJ, Li ZX, 2018. Both farnesyl diphosphate synthase genes are involved in the production of alarm pheromone in the green peach aphid *Myzus persicae*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 100(3): e21530.

Garbuzov A, Tatar M, 2010. Hormonal regulation of *Drosophila* microRNA *Let*-7 and *miR*-125 that target innate immunity. *Fly (Austin)*, 4(4): 306－311.

Gomez-Orte E, Belles X, 2009. MicroRNA-dependent metamorphosis in hemimetabolan insects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106(51): 21678－21682.

Gong L, Cui F, Sheng C, Lin Z, Reeck G, Xu J, Kang L, 2012. Polymorphism and methylation of four genes expressed in salivary glands of Russian wheat aphid (Homoptera: Aphididae). *J. Econ. Entomol.*, 105(1): 232－241.

Hardie J, 1980. Juvenile hormone mimics the photoperiodic apterization of the alate gynopara of aphid, *Aphis fabae*. *Nature*, 286(5773): 602－604.

Kennerdell JR, Carthew RW, 1998. Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that frizzled and frizzled 2 act in the wingless pathway. *Cell*, 95(7): 1017－1026.

König A, Shcherbata HR, 2015. Soma influences GSC progeny differentiation via the cell adhesion-mediated steroid-*let*-7-Wingless signaling cascade that regulates chromatin dynamics. *Biol. Open*, 4(3): 285－300.

Kucherenko MM, Barth J, Fiala A, Shcherbata HR, 2012. Steroid-induced microRNA *let*-7 acts as a spatio-temporal code for neuronal cell fate in the developing *Drosophila* brain. *EMBO J.*, 31(24): 4511-4523.

Li X, Zhang F, Coates B, Zhang Y, Zhou X, Cheng D, 2016. Comparative profiling of microRNAs in the winged and wingless English grain aphid, *Sitobion avenae* (F.) (Homoptera: Aphididae). *Sci. Rep.*, 6: 35668.

Li XM, Qiu WJ, Cui B, Yang ZL, Shen YW, Lu YP, Kan YC, Li DD, 2018. Cellular location of antisense oligonucleotide of snoRNA Bm-15 and its interference efficiency with Bm-15 in *Spodoptera frugiperda* Sf9 cells. *Acta Entomol. Sin.*, 61(7): 795-800. [李新梅, 邱妩洁, 崔斌, 杨宗霖, 申雅文, 路一平, 阚云超, 李丹丹, 2018. 草地贪夜蛾 Sf9 细胞中 snoRNA Bm-15 反义寡核苷酸的定位及其对 Bm-15 的干涉效率. 昆虫学报, 61(7): 795-800]

Li Z, Zeng B, Ling L, Xu J, You L, Aslam AF, Tan A, Huang Y, 2015. Enhancement of larval RNAi efficiency by over-expressing *Argonaute*2 in *Bombyx mori*. *Int. J. Biol. Sci.*, 11(2): 176-185.

Ling L, Ge X, Li Z, Zeng B, Xu J, Aslam AF, Song Q, Shang P, Huang Y, Tan A, 2014. MicroRNA *Let*-7 regulates molting and metamorphosis in the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 53: 13-21.

Liu Z, Huang XL, Jiang LY, Qiao GX, 2009. The species diversity and geographical distribution of aphids in China (Hemiptera, Acridoididae). *Acta Zootaxonom. Sin.*, 34(2): 277-291. [刘征, 黄晓磊, 姜立云, 乔格侠, 2009. 中国蚜虫类昆虫物种多样性与分布特点(半翅目, 蚜总科). 动物分类学报, 34(2): 277-291]

Müller CB, Williams IS, Hardie J, 2001. The role of nutrition, crowding, and interspecific interactions in the development of winged aphids. *Ecol. Entomol.*, 26(3): 330-340.

National Agricultural Technology Extension Center, 2019. Forecast of the occurrence trend of major crop pests and diseases in China. *China Plant Prot.*, 39(2): 36-39. [全国农业技术推广中心, 2019. 全国农作物重大病虫害发生趋势预报. 中国植保导刊, 39(2): 36-39]

Prochnik SE, Rokhsar DS, Aboobaker AA, 2007. Evidence for a microRNA expansion in the bilaterian ancestor. *Dev. Genes. Evol.*, 217(1): 73-77.

Qiao GX, Zhang GX, Zhong TS, 2005. China Fauna, Insecta, Vol. 41. Homoptera: Drepanosiphidae. Sciences Press, Beijing. 476 pp. [乔格侠, 张广学, 钟铁森, 2005. 中国动物志, 昆虫纲, 第 41 卷. 同翅目, 斑蚜科. 北京: 科学出版社. 476 页]

Rehmsmeier M, Steffen P, Hochsmann M, Giegerich R, 2004. Fast and effective prediction of microRNA/target duplexes. *RNA*, 10(10): 1507-1517.

Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, Horvitz HR, Ruvkun G, 2000. The 21-nucleotide *let*-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 403(6772): 901-906.

Sempere LF, Dubrovsky EB, Dubrovskaya VA, Berger EM, Ambros V, 2002. The expression of the *Let*-7 small regulatory RNA is controlled by ecdysone during metamorphosis in *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.*, 244(1): 170-179.

Sokol NS, Xu P, Jan YN, Ambros V, 2008. *Drosophila Let*-7 microRNA is required for remodeling of the neuromusculature during metamorphosis. *Genes Dev.*, 22(12): 1591-1596.

Vellichirammal NN, Gupta P, Hall TA, Brisson JA, 2017. Ecdysone signaling underlies the pea aphid transgenerational wing polyphenism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 114(6): 1419-1423.

Vellichirammal NN, Madayiputhiya N, Brisson JA, 2016. The genomewide transcriptional response underlying the pea aphid wing polyphenism. *Mol. Ecol.*, 25(17): 4146-4160.

Walsh TK, Brisson JA, Robertson HM, Gordon K, Jaubert-Possamai S, Tagu D, Edwards OR, 2010. A functional DNA methylation system in the pea aphid, *Acyrthosiphon pisum*. *Insect Mol. Biol.*, 19 (Suppl. 2): 215-228.

Xu HJ, Xue J, Lu B, Zhang XC, Zhuo JC, He SF, Ma XF, Jiang YQ, Fan HW, Xu JY, Ye YX, Pan PL, Li Q, Bao YY, Nijhout HF, Zhang CX, 2015. Two insulin receptors determine alternative wing morphs in planthoppers. *Nature*, 519(7544): 464-467.

Zera AJ, Denno RF, 1997. Physiology and ecology of dispersal polymorphism in insects. *Annu. Rev. Entomol.*, 42: 207-230.

Zhang CX, Brisson JA, Xu HJ, 2018. Molecular mechanisms of wing polymorphism in insects. *Annu. Rev. Entomol.*, 64: 297-314.

Zhang RJ, Chen J, Jiang LY, Qiao GX, 2019. The genes expression difference between winged and wingless bird cherry-oat aphid *Rhopalosiphum padi* based on transcriptomic data. *Sci. Rep.*, 9(1): 4754.

Zheng Y, Hu YS, Yan S, Zhou H, Song DL, Yin MZ, Shen J, 2019. A polymer/detergent formulation improves dsRNA penetration through the body wall and RNAi-induced mortality in the soybean aphid *Aphis glycines*. *Pest Manag. Sci.*, 75(7): 1993-1999.

Zhou CY, Zha XF, Liu HW, Xia QY, 2017. Zinc finger protein rotund deficiency affects development of the thoracic leg in *Bombyx mori*. *Insect Sci.*, 24(3): 385-396.

(责任编辑: 马丽萍)